

Neue Carbopyronin-Fluoreszenz-Farbstoffe

Beschreibung

5 Die Erfindung betrifft die Verwendung von Carbopyroninverbindungen der allgemeinen Formel (I) als Markierungsgruppen in Verfahren zum Nachweis von Analyten, neue Carbopyroninverbindungen sowie ein Verfahren zur Herstellung dieser Verbindungen.

10 In der chemischen, medizinischen und biologischen Analytik werden Farbstoffe als Markierungs- bzw. Nachweisgruppen verwendet. Insbesondere Fluoreszenzfarbstoffe haben in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen und andere vielfach kostenintensive Verfahren verdrängt, die beispielsweise Radioisotope zur Markierung verwenden.

15 Insbesondere im Bereich der DNA-Sequenzierung haben sich fluorometrische Verfahren in den letzten Jahren durchgesetzt und die bis dahin üblichen Verfahren, die radioaktive Isotope verwenden, fast völlig verdrängt.

20 Trotz der Verfügbarkeit von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, wie beispielsweise FITC (Fluoresceinisothiocyanat), FLUOS (Fluorescein-N-hydroxysuccinimidester), Rhodamin-Derivate etc., konnten bisher die Probleme durch Hintergrundfluoreszenz, unspezifische Bindungsphänomene sowie Notwendigkeit kostenintensiver Meßapparaturen nicht in befriedigender Weise gelöst werden.

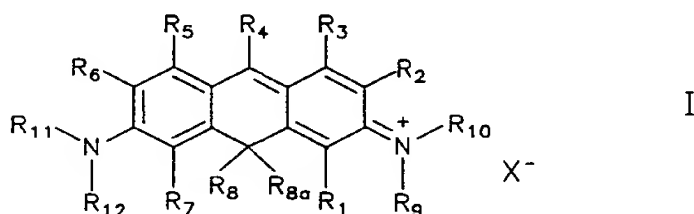
Durch Hintergrundfluoreszenz und unspezifische Bindungen wird die Empfindlichkeit und Genauigkeit der Messungen verringert. Des weiteren liegt bei verfügbaren Fluoreszenzfarbstoffen das Absorptionsmaximum in Bereichen, die die Verwendung kostengünstiger und klein dimensionierbarer Lichtquellen, wie beispielsweise He-Ne-Laser und Laserdioden, nicht ermöglichen.

30

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand somit darin, Fluoreszenzfarbstoffe bereitzustellen, die als Markierungsgruppe in Nachweisverfahren von Analyten eingesetzt werden können und die Nachteile des Standes der Technik zumindest teilweise vermeiden.

5

Diese Aufgabe wurde gelöst durch die Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



als Markierungsgruppen in einem Verfahren zum Nachweis eines Analyten, wobei

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 und R_7 jeweils unabhängig Wasserstoff, Halogen, eine Hydroxy-, Amino-, Sulfo- oder Carboxy- oder Aldehydgruppe oder eine gesättigte oder ungesättigte, geradkettige, verzweigte oder cyclische Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 20 C-Atomen bedeuten, wobei die Kohlenwasserstoffgruppen Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Cycloalkyl-, Aryl-, insbesondere Phenyl-, oder/und Heteroarylreste umfassen und gegebenenfalls Heteroatome wie Sauerstoff-, Schwefel- oder Stickstoffatome oder/und mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Phospho-, Carboxy-, Aldehyd-, C_1 - C_4 -Alkoxy- oder/und C_1 - C_4 -Alkoxycarbonylgruppen enthalten, oder einer oder mehrere der Reste R_1 - R_7 jeweils mit benachbarten Substituenten ein Ringsystem bilden, das eine oder mehrere Mehrfachbindungen enthalten kann,

R_8 und R_{8a} jeweils unabhängig eine gesättigte oder ungesättigte, geradkettige, verzweigte oder cyclische Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 20 Kohlenstoffatomen, z.B. eine C_1 - C_6 -Alkylgruppe, insbesondere Methyl, Ethyl, Propyl oder/und Butyl, oder eine Aryl- oder Heteroarylgruppe, insbesondere Phenyl, bedeuten, die gegebenenfalls Heteroatome wie Sauerstoff-, Schwefel- oder Stickstoffatome oder/und einen oder mehrere Substituenten, vor-

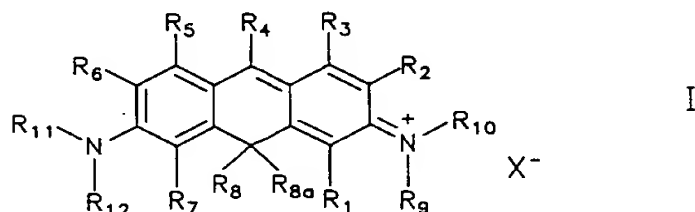
zugsweise ausgewählt aus Halogenen, Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Phospho-, Carboxy-, Aldehyd-, C₁-C₄-Alkoxy- oder/und C₁-C₄-Alkoxy-carbonylgruppen, enthalten, oder auch R₈ und R_{8a} ein Ringsystem bilden können, R₉, R₁₀, R₁₁ und R₁₂ jeweils unabhängig Wasserstoff oder eine gesättigte oder ungesättigte, geradkettige, verzweigte oder cyclische Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 20 C-Atomen, z.B. Polyether, Phenyl, Phenylalkyl mit 1-3 C-Atomen in der Kette bedeuten, wobei die Kohlenwasserstoffgruppen gegebenenfalls Heteroatome wie Sauerstoff-, Schwefel- oder Stickstoffatome oder/und einen oder mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Phospho-, Carboxy-, Carbonyl-, Alkoxy- oder/und Alkoxy-carbonylgruppen enthalten können, oder einer oder mehrere der Reste R₉-R₁₂ jeweils mit benachbarten Substituenten ein Ringsystem bilden, das eine oder mehrere Mehrfachbindungen enthalten kann, wobei -N(R₉)(R₁₀) oder/und =N(R₁₁)(R₁₂) durch -OR⁹ oder/und =O ersetzt sein können, und X gegebenenfalls zum Ladungsausgleich vorhandene Anionen bedeutet.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) können als Markierungsgruppen in Verfahren zur qualitativen oder/und quantitativen Bestimmung eines Analyten eingesetzt werden. Diese Bestimmung kann in wässrigen Flüssigkeiten, z.B. Proben von Körperflüssigkeiten wie etwa Blut, Serum, Plasma oder Urin, Abwasserproben oder Lebensmitteln, durchgeführt werden. Das Verfahren kann sowohl als Naßtest, z.B. in einer Küvette, oder als Trockentest auf einem entsprechenden Reagenzträger durchgeführt werden. Die Bestimmung des Analyten kann hierbei mittels einer einzigen Reaktion oder durch eine Sequenz von Reaktionen erfolgen. Überraschenderweise zeigte die Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) sehr gute Ergebnisse in chemischen und insbesondere in medizinischen und biologischen Nachweisverfahren zur Bestimmung eines Analyten, speziell in Nukleinsäure-Sequenzierverfahren sowie in der Proteinanalytik..

Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) können in allen dem Fachmann bekannten chemischen, medizinischen und biologischen Nachweisverfahren, in denen Fluoreszenzfarbstoffe als Markierungsgruppe geeignet sind, verwendet werden. Hierzu werden die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) im allgemeinen kovalent an einen für den nachzuweisenden Analyten spezifischen Rezeptor gekoppelt. Dies geschieht mit allgemein bekannten Verfahren. Der spezifische Rezeptor kann jede geeignete Verbindung oder jedes geeignete Molekül sein, vorzugsweise ist es ein Peptid, ein Polypeptid oder eine Nukleinsäure. Die Verbindungen oder Konjugate dieser Verbindungen können beispielsweise in Nukleinsäure-Hybridisierungsverfahren, insbesondere für die Sequenzierung von Nukleinsäuren oder immunchemischen Verfahren verwendet werden. Derartige Verfahren sind beispielsweise beschrieben in Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand darin, neue Carbopyronin-Verbindungen bereitzustellen, die insbesondere zur Verwendung als Markierungsgruppe in Nachweisverfahren von Analyten geeignet sind, mit einfachen und kostengünstigen Verfahren hergestellt werden können, problemlos handhabbar sind und die Nachteile des Standes der Technik zumindest teilweise vermeiden.

Diese Aufgabe wurde gelöst durch eine Verbindung der allgemeinen Formel (I)



wobei R_1 - R_{12} und X die oben angegebenen Bedeutungen besitzen, mit der Maßgabe, daß, wenn R_1 - R_3 und R_5 - R_7 Wasserstoff sind und R_8 , R_{8a} und R_9 - R_{12} Methyl sind,

R₄ nicht Wasserstoff, Methyl, Isopropyl, Phenyl, 2,6-Dimethylphenyl- oder 2-Isopropenylphenyl ist.

Ein Vorteil der Verbindungen (I) ist, daß durch eine fast beliebige Substituentenvariation die Eigenschaften einzelner Verbindungen, z.B. die spektroskopischen Eigenschaften, die Lage der Absorptions- und Fluoreszenzmaxima, die Löslichkeitseigenschaften, die Fluoreszenz-Quantenausbeute und -Abklingzeit, stark variiert und somit wie gewünscht ausgewählt werden können. Auf diese Weise können Interferenzen mit Störsubstanzen in Proben wie Serum, Blut oder Plasma etc. vermindert oder sogar ganz vermieden werden. Die Herstellung einiger Verbindungen der Formel (I) kann nach an sich bekannten Verfahren erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die Synthese jedoch nach einem neuen, im folgenden beschriebenen Verfahren, das besonders einfach und kostengünstig ist.

15

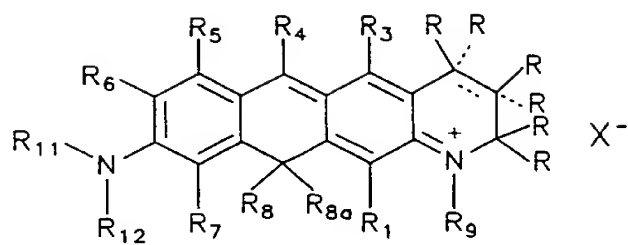
In einer bevorzugten Klasse der Verbindungen (I) sind R₆ mit R₁₁ oder/und R₇ mit R₁₂, R₁ mit R₁₀ oder/und R₂ mit R₉ verbrückt und bilden ein Ringsystem, das eine oder mehrere Mehrfachbindungen enthalten kann. Vorzugsweise enthält das Ringsystem einen oder mehrere 5- oder 6-gliedrige Ringe.

20

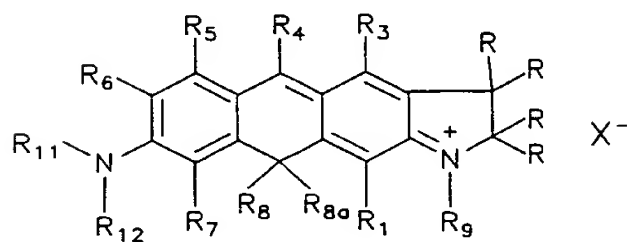
R₄ bedeutet vorzugsweise Wasserstoff, C₁-C₆-Alkyl oder einen ein aromatisches Ringsystem enthaltenden Rest, z.B. einen Carboxy- oder/und Halogengruppen enthaltenden Rest wie 2-Carboxy-phenyl, 2-Carboxy-tetrachlorphenyl oder Pentafluorphenyl. R₈ und R_{8a} sind vorzugsweise jeweils unabhängig Methyl, Ethyl oder/und gegebenenfalls substituiertes Phenyl.

25

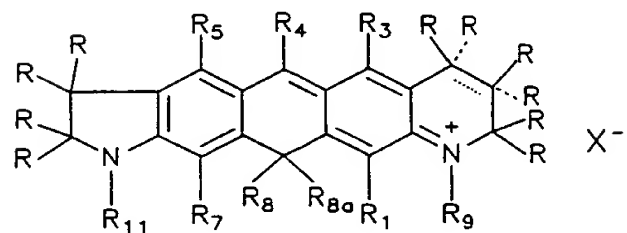
Beispiele für besonders bevorzugte Verbindungsklassen sind in den allgemeinen Formeln IVa bis IVe dargestellt:



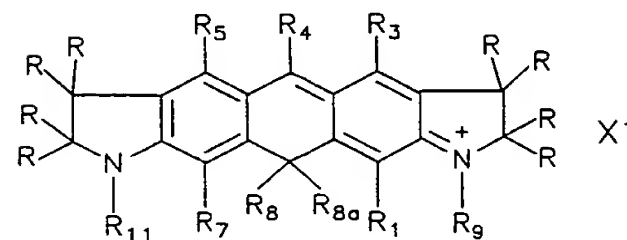
IVa



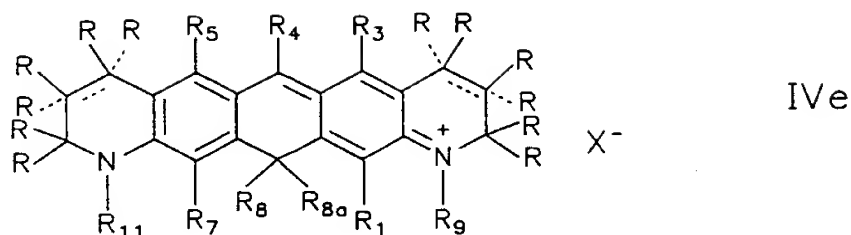
IVb



IVc



IVd



worin die gestrichelten Linien gegebenenfalls Doppelbindungen bedeuten, bei deren Vorhandensein die über eine gestrichelte Linie gebundenen Reste R fehlen,

- 5 $R_1, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{8a}, R_9, R_{11}, R_{12}$ und X wie oben definiert sind, und R bei jedem Auftreten gleich oder verschieden sein kann und wie R_1 - R_7 oben definiert ist.

Die Verbindungen weisen vorzugsweise eine zur kovalenten Kopplung fähige Gruppe auf, z.B. $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ oder/und $-\text{SH}$. Über diese Kopplungsgruppe kann die Verbindung nach bekannten Methoden an einen Träger oder/und an ein Biomolekül gekoppelt werden. Der Träger kann aus jedem geeigneten, insbesondere für Nachweisverfahren geeigneten Material bestehen, z.B. aus porösem Glas, Kunststoffen, Ionenaustauschharzen, Dextranen, Cellulose, Cellulosederivaten oder/und hydrophilen Polymeren. Die Biomoleküle werden vorzugsweise ausgewählt aus Peptiden, Polypeptiden, Nukleotiden, Nukleosiden, Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloga oder/und Haptenen.

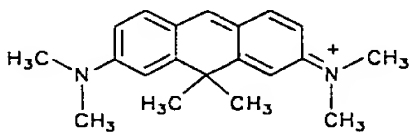
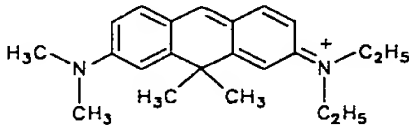
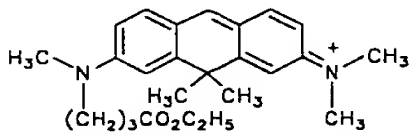
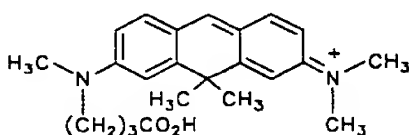
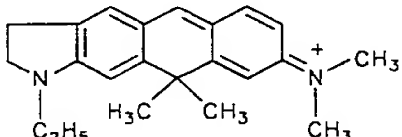
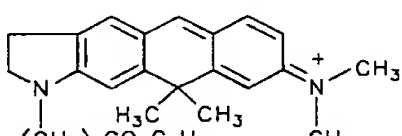
20 Überraschenderweise werden die Absorptionsmaxima und die Fluoreszenzquantenausbeute durch eine Kopplung der erfindungsgemäßen Verbindungen an die oben genannten Träger und Biomoleküle nicht wesentlich verändert.

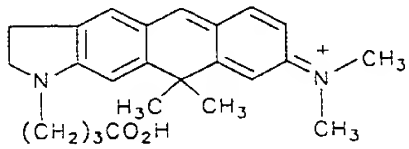
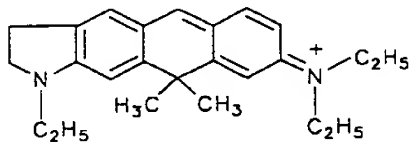
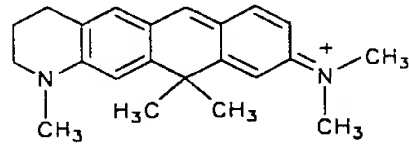
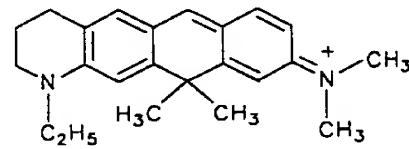
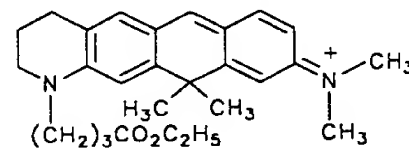
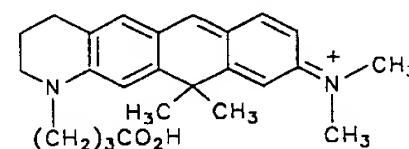
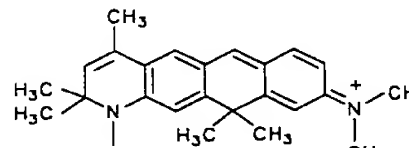
25 Konkrete Beispiele für erfindungsgemäße Verbindungen sind in der folgenden Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

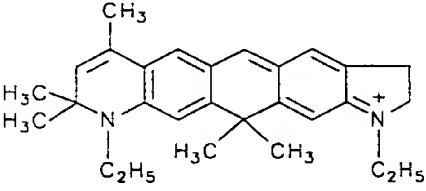
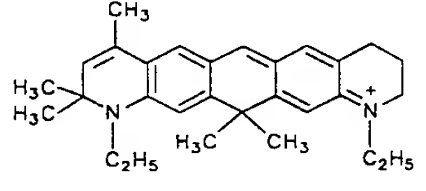
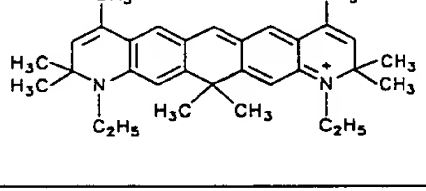
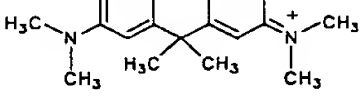
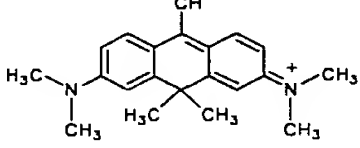
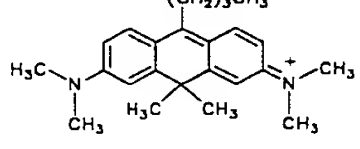
 λ_A : Absorptionsmaximum λ_F : Fluoreszenzmaximum Q_F : Fluoreszenzquantenausbeute in Ethanol

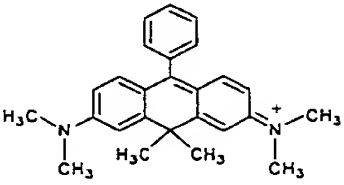
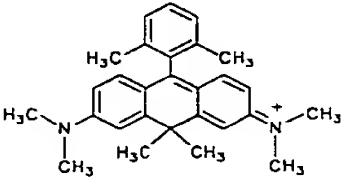
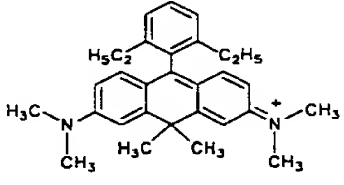
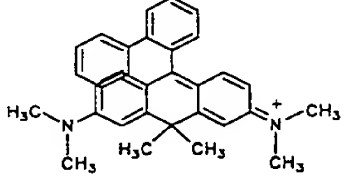
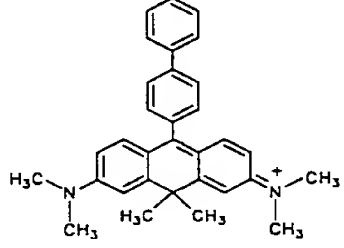
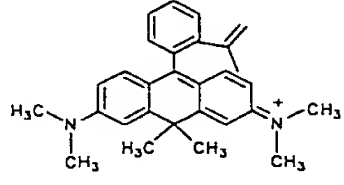
5

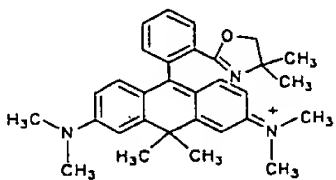
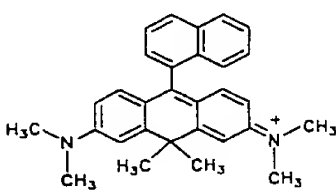
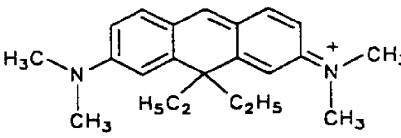
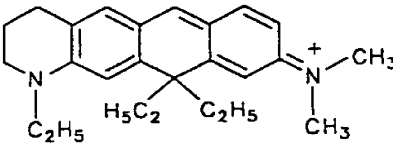
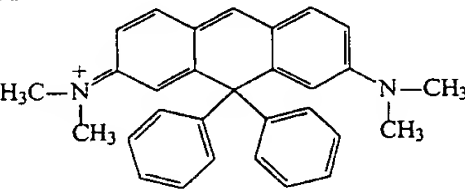
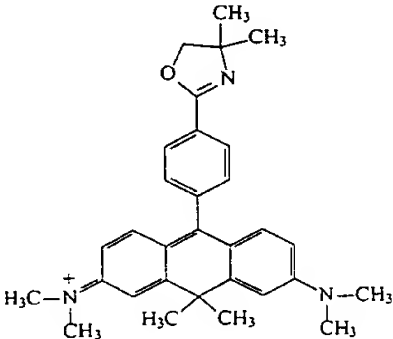
	Struktur	λ_A / nm	λ_F / nm	Q_F / %
1 Cp 149		606	627	71
2 AZ 6		608	630	65
3 JA 261		608	630	70
4 JA 262		608	630	70
5 AZ 1		617	641	77
6 AZ 4		617	641	78

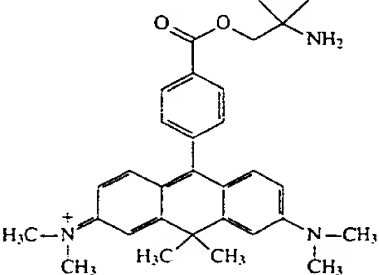
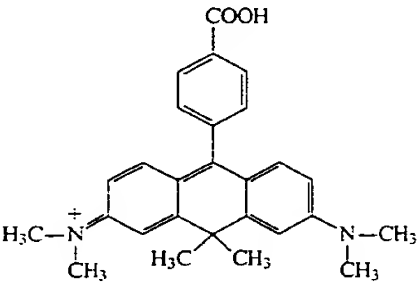
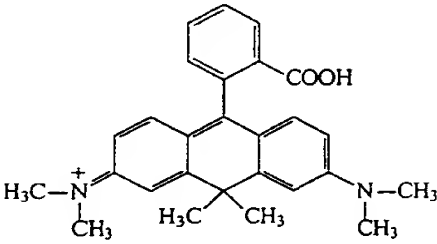
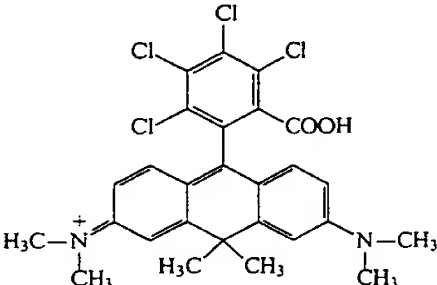
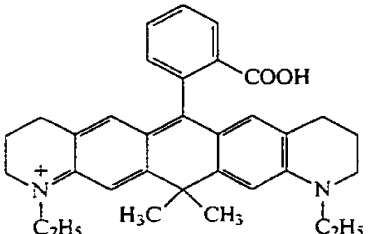
7 AZ 14		617	641	78
8 AZ 7		618	642	75
9 JA 260		616	640	75
10 JA 264		616	640	75
11 JA 263		616	640	76
12 JA 266		616	640	76
13 JA 265		634	658	62

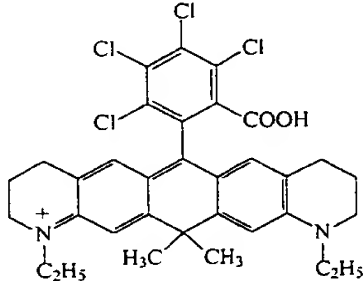
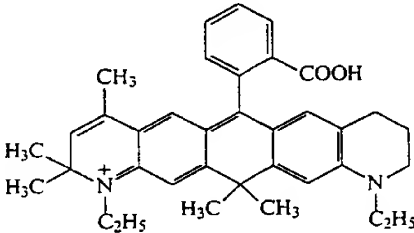
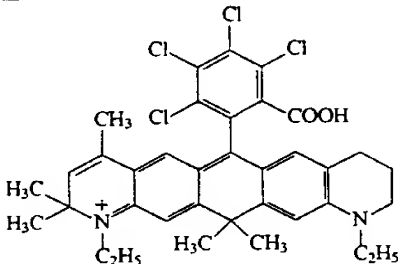
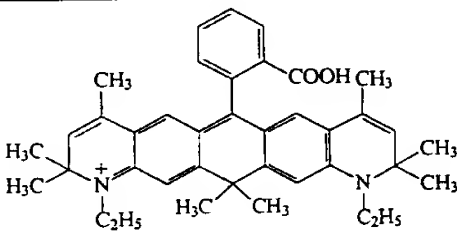
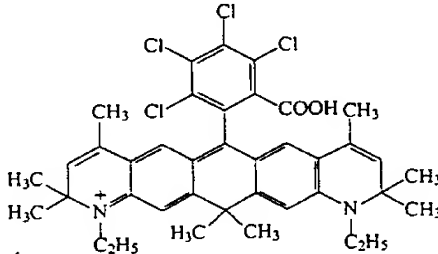
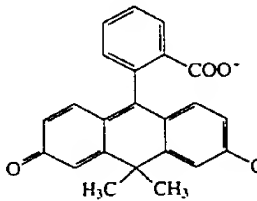
14 AZ 8		641	666	60
15 JA 267		633	660	60
16 JA 268		634	660	58
17 AZ 2		633	657	63
18 AZ 5		633	657	61
19 AZ 3		629	650	69
20 AZ 13		626	648	87

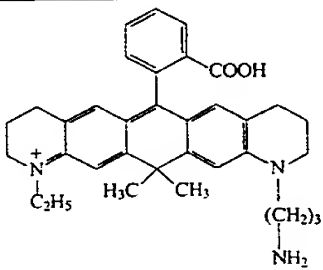
21 AZ 9		647	675	55
22 AZ 12		647	664	58
23 AZ 11		664	688	49
24 JF 19		602	643	58
25 JF 20		604	675	41
26 JF 18		601	636	67

27 JF 16		611	638	6
28 JF 21		610	637	46
29 JF 22		612	641	41
30 JF 24		617	643	71
31 JF 25		613	638	6
32 JF 26		611	640	59

33 JF 17		610	640	70
34 JF 23		618	643	60
35 AZ 16		606	628	70
36 AZ 17		615	640	75
37 AZ 18		627	655	62
38 JF30		621	652	4

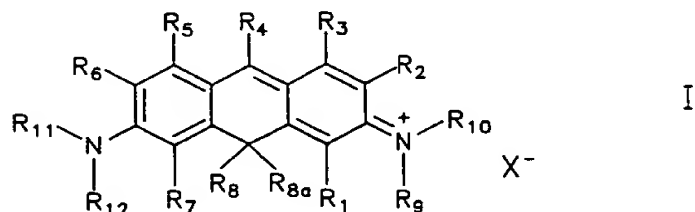
39 JF 31		618	648	5
40 JF 32		618	647	5
41 JF 34		612	642	75
42 JF 35		642	672	64
43 JF 36		632	662	85

44 JF 37		662	692	60
45 JF 38		653	683	70
46 JF 39		683	713	45
47 JF 40		670	700	55
48 JF 41		700	730	40
49 JF 42		557	577	95

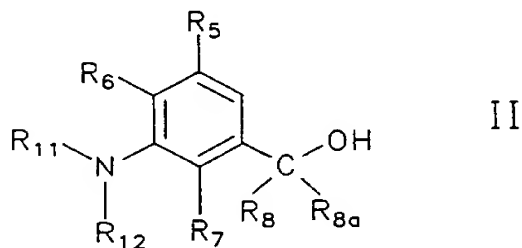
50 JF 43		632	660	80
-------------	---	-----	-----	----

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand in der Bereitstellung eines Herstellungsverfahrens für Carbopyronin-Verbindungen, das einfach, umweltverträglich und kostengünstig durchführbar ist und das die Nachteile der bekannten Verfahren zur Herstellung von Carbopyroninen zu-

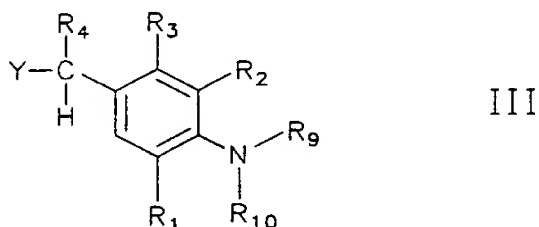
Diese Aufgabe wurde erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



wobei R₁-R₁₂ und X die in Anspruch 1 angegebenen Bedeutungen besitzen, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Verbindung der allgemeinen Formel (II)



worin R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_{8a} , R_{11} und R_{12} wie oben definiert sind, oder das Dehydratationsprodukt von II mit einer Verbindung der allgemeinen Formel III oder deren Dehydratationsprodukt



5 worin R_1 - R_4 , R_9 und R_{10} wie oben definiert sind und
Y ein Halogen, insbesondere Brom, eine Hydroxy- oder Thiogruppe bedeutet,

in einem geeigneten Lösungsmittel, unter sauren Bedingungen und in Gegenwart eines Katalysators umgesetzt und die durch Ringschluß zwischen den
10 Verbindungen II bzw. deren Dehydratationsprodukt und III gebildete Verbindung durch Oxidation zu Struktur I umgesetzt. Alternativ können die Verbindungen II oder deren Dehydratationsprodukt mit dem Dehydratationsprodukt von III umgesetzt werden, wobei direkt – ohne Oxidationsschritt – die Struktur I entsteht.

15

In dem Verfahren können alle geeigneten Lösungsmittel verwendet werden, die mit den Edukten, den Produkten und dem Katalysator, vorzugsweise Bortrichlorid, kompatibel sind. Vorzugsweise ist das Lösungsmittel ein unpolares Lösungsmittel, insbesondere Methylenchlorid, 1,2-Dichlorethan oder
20 Chloroform.

Als Säuren können gebräuchliche Säuren eingesetzt werden. Vorzugsweise ist die Säure eine anorganische Säure wie Schwefelsäure, Phosphorsäure oder Polyphosphorsäure.

25

Als Oxidationsmittel können ebenfalls gebräuchliche Oxidationsmittel verwendet werden. Bevorzugt ist das Oxidationsmittel Tetrabutylammonium(meta)periodat.

- 5 Besonders vorteilhaft ist, daß das Verfahren ohne Isolierung von Zwischenprodukten durchgeführt werden kann. Dies führt zu einer Verringerung des Zeit-, Arbeits- und Materialaufwandes.

Die Erfindung wird durch nachstehende Beispiele näher erläutert. Die Abbildungen 1, 2, 3 und 4 zeigen die Absorptions- und Fluoreszenzspektren der erfindungsgemäßen Verbindungen AZ 2 (17), AZ 13 (20), JA 268 (16) und AZ11 (23).

15 Beispiele

A. Erfindungsgemäßes Herstellungsverfahren für Carbopyronin-Verbindungen

- 20 Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird 4-N,N-Dimethylaminobenzylsulfanilsäure, die in dem Verfahren nach Aaron und Barker (J. Chem. Soc. (1963), 2655) verwendet wird, durch 4-Hydroxymethyl-N,N-dimethylanilin ersetzt und in Gegenwart von Bortrichloridlösung als Katalysator mit dem Isopropenylderivat zum Carbopyronin umgesetzt. Die Reaktionsmischung
- 25 läßt sich ohne Isolierung des Zwischenproduktes mit konzentrierter Schwefelsäure zur Leukobase des Farbstoffs umsetzen. Das bei Aaron und Barker (a.a.o.) verwendete Oxidationsmittel Bleidioxid wird durch Tetrabutylammonium(meta)periodat ersetzt. Dazu wird die ethanolische Lösung aus Oxidationsmittel und Leukobase zum Sieden erhitzt, wobei dünnschichtchromatographisch zu erkennen ist, daß die Oxidation schon nach wenigen Minuten
- 30 abgeschlossen ist.

Nach der Oxidation wird das Carbopyronin aus ethanolischer Lösung durch Zugabe von 10 %-iger Natriumperchloratlösung und langsames Zutropfen von Wasser als schwerlösliches Perchlorat ausgefällt.

5 Der neue Syntheseweg ist universell einsetzbar. Es können aus Anilin-, Indolin-, Tetrahydrochinolin- und 1,2-Dihydrochinolin-Derivaten durch eine Vilsmaier-Synthese mit anschließender Reduktion die entsprechenden Alkohole erhalten und diese mit einem Isopropenyl-Derivat zum Farbstoff umgesetzt werden. Im Gegensatz zur Synthese von Aaron und Barker verläuft die Syn-
10 these in einem Schritt, d.h. eine Isolierung von Zwischenprodukten ist nicht notwendig.

Die Synthesevorschriften für die Verbindungen JA 261, JA 262, AZ 4, AZ 14, JA 267, JA 268, JF 19, JF 22 und JF 17 sind im Folgenden dargestellt.

15

B. Synthesebeispiele

Verbindung JA 261

20 1 g (4 mmol) N-Methyl-N-(4-hydroxymethyl-phenyl)-4-aminobuttersäureethylester und 0,71 g (4,4 mmol) 3-(Isopropenyl)-N,N-dimethylanilin werden in 20 ml Methylenchlorid gelöst. Unter Rühren und Eiskühlung setzt man langsam 4 ml einer 1 molaren BCl₃-Lösung (in Methylenchlorid) zu. Die Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur verrührt. Anschließend tropft man die Reaktionsmischung in 20 g konzentrierte Schwefelsäure, welche im Eis/Methanol-Bad ge-
25 kühlt wird. Man verrührt solange, bis eine homogene Lösung vorliegt. Das Methylenchlorid wird am Rotationsverdampfer abdestilliert. Die schwefelsaure Lösung wird über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend wird die Lösung auf Eis gegossen und mit verdünnter Natronlauge neutralisiert. Die wässrige Lösung wird mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Pha-
30 sen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und zur Trockene einrotiert. Der Rückstand wird in 200 ml Ethanol aufgenommen, mit 10 Tropfen 60 %-iger

Perchlorsäure und 0,17 g (0,39 mmol) Tetrabutylammonium(meta)periodat versetzt. Die Lösung wird 30 min zum Rückfluß erhitzt. Die abgekühlte Lösung wird in eine Lösung aus 20 g Natriumperchlorat in 1 l Wasser eingetropft. Man verrührt über Nacht. Der grün-glänzende Niederschlag wird abfiltriert und im
5 Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 0,56 g

¹H-NMR-Daten in CDCl₃:

δ 1,25 (T, 3H, -CH₃); 1,7 (S, 6H, -CH₃); 2,0 (Ql, 2H, -CH₂-); 2,5 (T, 2H, -CH₂-);
3,3 (S, 9H, N-CH₃); 3,7 (T, 2, -CH₂-); 4,15 (Q, 2H, N-CH₂-); 6,85 (DvD, 2H,
10 ArH); 7,05 (D, 1H, ArH); 7,2 (D, 1H, ArH); 7,65 (D, 2H, Ar-H); 8,0 (S, 1H, -CH=)

Verbindung JA 262

15 100 mg JA 261 werden in einer Mischung aus 20 ml Aceton, 40 ml Wasser und 2 ml 2 N Salzsäure gelöst. Die Lösung wird zum Rückfluß erhitzt (Innentemperatur: 64 °C). Nach 24 h wird die Lösung abgekühlt und mit 100 ml 10 %-iger wässriger Natriumperchloratlösung versetzt. Der Niederschlag wird abfiltriert und getrocknet.

20 Ausbeute: 0,04 g

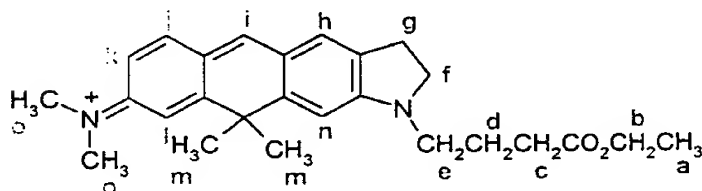
Verbindung AZ 4

25 1,00 g (4,25 mmol) 4-(5-Hydroxymethylindolin-1-yl)-buttersäureethylester und 0,76 g (4,25 mmol) 3-(Isopropenyl)-N,N-dimethylanilin werden in 15 ml Methylenchlorid gelöst und unter Eiskühlung tropfenweise mit 4,25 ml (4,25 mmol) einer 1 molaren Lösung von Bortrichlorid in Hexan versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 30 min bei Raumtemperatur verrührt. Anschließend
30 tropft man das Reaktionsgemisch in 10 ml konzentrierte Schwefelsäure und läßt 1 h bei Raumtemperatur rühren. Die tief rot gefärbte Reaktionsmischung wird in 100 ml eiskaltes Ethanol getropft, mit 0,78 g (1,8 mmol) Tetrabutyl-

lammonium(meta)periodat versetzt und 3 min zum Sieden erhitzt. Man läßt auf Raumtemperatur abkühlen und versetzt mit 50 ml 20 %-iger Natriumperchloratlösung. Anschließend werden zum vollständigen Ausfällen des Farbstoffes 300 ml Wasser zugetropft. Das kristalline Produkt wird abfiltriert und im Exsikkator unter Vakuum mit SICAPENT[®] getrocknet.

Ausbeute: 0,7 g

¹H-NMR-Daten in Aceton-d₆:

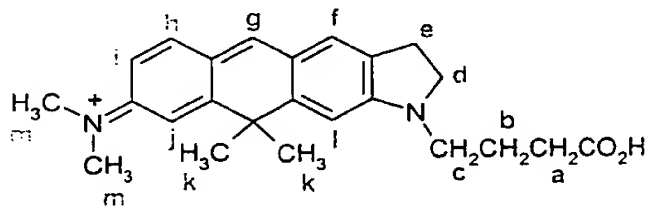


δ 0,9 (T, 3H, -CH₃ a); 1,7 (S, 6H, -CH₃ m); 2,47 (T, 2H, -CH₂- c); 3,22 (T, 2H, -CH₂- g); 3,34 (S, 6H, N-CH₃ o); 3,8 (T, 2, -CH₂- e); 4,09 (T, 2H, -CH₂- f); 4,42 (Q, 2H, -CH₂- b); 6,95 (DvD, 1H, ArH k); 7,22 (D, 1H, ArH l); 7,3 (S, 1H, ArH n); 7,7 (D, 1H, Ar-H j); 8,08 (S, 1H, -CH= i)

15 Verbindung AZ 14

4 g (8 mmol) AZ 4 werden in 30 ml Wasser und 20 ml Aceton gelöst und mit 1 ml 2 N Salzsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 18 h zum Rückfluß erhitzt. Man versetzt mit 50 ml Chloroform und trennt die organische Phase ab. Nach weiterer dreimaliger Extraktion mit Chloroform werden die vereinigten organischen Phasen mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Die Farbstofflösung wird am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und anschließend säulenchromatographisch gereinigt.

¹H-NMR-Daten in Aceton-d₆:



δ 1,72 (S, 6H, -CH₃ k); 2,0 (M, 2H, -CH₂- b); 2,49 (T, 3H, -CH₂- a); 3,25 (T, 2H, -CH₂- e); 3,34 (S, 6H, -CH₃ m); 3,81 (T, 2, -CH₂- c); 4,11 (T, 2H, -CH₂- d); 6,95 (DvD, 1H, ArH i); 7,22 (D, 1H, ArH j); 7,3 (S, 1H, ArH l); 7,42 (S, 1H, Ar-H f); 7,7 (D, 1H, ArH h); 8,1 (S, 1H, -CH= g)

5

Verbindung JA 267

1,2 g (3,8 mmol) 4-(6-Hydroxymethyl-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydrochinol-1-yl)-
10 buttersäureethylester und 0,68 g (3,8 mmol) 3-(Isopropenyl)-N,N-dimethylanilin
werden in 30 ml Methylenchlorid gelöst. Unter Rühren und Eiskühlung setzt
man langsam 4 ml einer 1 molaren BCl₃-Lösung in Methylenchlorid zu. Die Lö-
sung wird 20 min bei Raumtemperatur verrührt. Anschließend tropft man die
15 Reaktionsmischung in 20 ml konz. Schwefelsäure. Man verrührt solange, bis
eine homogene Lösung vorliegt. Das Methylenchlorid wird am Rota-
tionsverdampfer abdestilliert und die schwefelsaure Lösung 1 h bei Raumtem-
peratur verrührt. Der Rückstand wird in 400 ml eisgekühltem Ethanol aufge-
nommen. Dazu gibt man 1,2 g (2,7 mmol) Tetrabutylammonium(meta)periodat.
Die Lösung wird kurz zum Sieden erhitzt, abgekühlt und mit 200 ml einer 20 %-
20 igen Natriumperchlorat-Lösung versetzt. Anschließend tropft man 500 ml Was-
ser hinzu. Der Niederschlag wird abfiltriert und im Exsikkator getrocknet.

Verbindung JA 268

25

1,8 g JA 267 werden in einer Mischung aus 50 ml Aceton, 50 ml Wasser und 5
ml 2 N Salzsäure 6 h zum Rückfluß erhitzt. Das Lösungsmittel wird abdestilliert
und der Rückstand chromatographisch gereinigt.

30

Verbindung JF 19

Zu einer Lösung von 50 mg (0,16 mmol) 2,10-Bis-(dimethylamino)-anthron in 10 ml trockenem Tetrahydrofuran werden innerhalb einer Argonschutzgasatmosphäre bei Raumtemperatur tropfenweise 0,27 ml (0,81 mmol) einer 3 M Methylmagnesiumbromidlösung in Diethylether gegeben. Nach beendeter Reaktion kühlt man im Eis-Wasser-Bad ab, löst die Reaktionsmischung in 50 ml Ethanol und säuert mit Trifluoressigsäure an. Diese Lösung wird in einer Mischung aus 50 ml Chloroform und 50 ml Wasser suspendiert. Die organische Phase wird abgetrennt, am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt und in Ethanol gelöst. Anschließend wird in 100 ml wässrige 25 %-ige Natriumperchloratlösung getropft. Nach beendeter Zugabe werden noch 300 ml Wasser zugetropft. Der ausfallende Farbstoff wird filtriert und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,04g

15

Verbindung JF 22

Unter Argonschutz werden 11 mg (1,6 mmol) Lithiumpulver (0,5 % Natrium, Metallgesellschaft) in 2 ml trockenem Diethylether suspendiert. Hierzu tropft man unter Rühren eine Lösung von 0,17 g (0,8 mmol) 1-Brom-2,6-diethylbenzol in 4 ml Diethylether. Nach beendeter Zugabe läßt man 15 min bei Raumtemperatur rühren. Die Suspension wird über Glaswolle filtriert, um die verbleibenden Lithiumreste zu entfernen. Die so erhaltene Lösung wird bei Raumtemperatur zu einer Lösung von 50 mg (0,16 mmol) 2,10-Bis-(dimethylamino)-anthron in 10 ml trockenem Tetrahydrofuran getropft. Nach beendeter Reaktion kühlt man im Eis-Wasser-Bad ab, löst die Reaktionsmischung in 50 ml Ethanol und säuert mit Trifluoressigsäure an. Diese Lösung wird in einer Mischung aus 50 ml Chloroform und 50 ml Wasser suspendiert. Die organische Phase wird abgetrennt, am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt und säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt. Nachdem die Farbstofffraktion am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt wurde, wird in Ethanol gelöst und anschließend in 100 ml wässrige 25 %-ige

Natriumperchloratlösung getropft. Dann werden noch 300 ml Wasser zuge-
tropft. Der ausfallende Farbstoff wird filtriert und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,02 g

5

Verbindung JF 17

0,14 g (0,55 mmol) 2-(2-Bromphenyl)-4,4-dimethyl-2-oxazolin werden unter
Schutzgas (Argon) in 7,5 ml Tetrahydrofuran gelöst und auf -78 °C abge-
kühlt. Hierzu gibt man tropfenweise 0,7 ml (1,1 mmol) einer 1,6 M Lösung
10 von t-Butyllithium in Hexan, so daß die Temperatur unter - 75 °C bleibt. Nach
beendeter Zugabe läßt man 15 min rühren. Zu dieser Lösung gibt man 34 mg
(0,11 mmol) 2,10-Bis-(dimethylamino)-anthron in 2 ml trockenem Tetrahy-
drofuran. Die Temperatur sollte dabei - 70 °C nicht übersteigen. Anschlie-
15 ßend wird auf -60 °C erwärmt und 3 h verrührt. Man entfernt das Kältebad
und läßt auf Raumtemperatur erwärmen. Nach 24 h kühlt man im Eis-
Wasser-Bad ab, löst die Reaktionsmischung in 50 ml Ethanol und säuert mit
Trifluoressigsäure an. Diese Lösung wird in einer Mischung aus 50 ml Chlo-
roform und 50 ml Wasser suspendiert. Die organische Phase wird abge-
20 trennt, am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt und säulenchroma-
tographisch gereinigt. Die Farbstofffraktion wird am Rotationsverdampfer zur
Trockene eingeeengt, in Ethanol aufgenommen und anschließend in 100 ml
wässrige 25 %-ige Natriumperchloratlösung getropft. Nach beendeter Zuga-
be werden noch 300 ml Wasser zugetropft. Der ausfallende Farbstoff wird
25 filtriert und im Vakuum getrocknet.

Verbindung AZ 18**1. Stufe:****3-(N,N-Dimethylamino)-triphenylcarbinol**

- 5 2,8 g (0,12 mol) Magnesium und 10 ml Diethylether (absolut) werden mit 2,6 g (0,02 mol) Brombenzol versetzt. Um die Reaktion zu starten, wird leicht erwärmt. Der Reaktionsbeginn ist an der Trübung der Reaktionsmischung zu erkennen. Anschließend werden 16,2 g (0,1 mol) Brombenzol in 15 ml Ether gelöst und in die Reaktionsmischung getropft. Man erhitzt 1 h zum Rückfluß, wobei sich das Magnesium nahezu vollständig löst. Nach dem Abkühlen im Eisbad wird eine Lösung aus 10 g (0,055 mol) 3-Dimethylaminobenzoessäuremethylester in 15 ml absolutem Ether zugetropft. Nach der Zugabe wird die Reaktionsmischung 2 h zum Rückfluß erhitzt, abgekühlt und tropfenweise mit Wasser hydrolysiert. Man gibt 50 ml Wasser und 50 ml Ether zu und versetzt solange mit gesättigter Ammoniumchloridlösung, bis sich der weiße Niederschlag wieder gelöst hat. Die wässrige Phase wird mit Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und mit Wasser gewaschen. Anschließend wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Das zurückbleibende hellgelbe Öl kann direkt für die nachfolgende Reaktion verwendet werden.

2. Stufe:**AZ 18**

- 25 0,6 g (3 mmol) N,N-Dimethyl-4-hydroxymethyl-anilin und 0,9 g (3 mmol) 3-(N,N-Dimethylamino)-triphenylcarbinol werden in 30 ml Methylenchlorid gelöst. Unter Rühren und Eiskühlung setzt man langsam 4 ml einer 1 molaren BCl_3 -Lösung in Methylenchlorid zu. Die Lösung wird 2 h bei Raumtemperatur verrührt. Anschließend tropft man die Reaktionsmischung in 20 ml 70 %-ige Schwefelsäure. Das Methylenchlorid wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und die schwefelsaure Lösung 20 h bei Raumtemperatur verrührt. Der

- Rückstand wird langsam in 100 ml eisgekühltem Ethanol gelöst. Dazu gibt man 1,2 g (2,7 mmol) Tetrabutylammonium(meta)periodat. Die Lösung wird kurz zum Sieden erhitzt, abgekühlt und mit 100 ml einer 20 %-igen Natriumperchlorat-Lösung versetzt. Anschließend tropft man 250 ml Wasser hinzu.
- 5 Der Niederschlag wird abfiltriert und im Exsikkator getrocknet.

Verbindung JF 30

- 10 1.85 ml (3.05 mmol) einer 15 %-igen t-Butyllithiumlösung (in n-Pentan) werden bei - 78 °C zu einer Lösung von 0.39 g (1.53 mmol) 2-(4-Brom-phenyl)-4,4-dimethyl-2-oxazolin in 20 ml trockenem Tetrahydrofuran gegeben, so daß die Temperatur unterhalb - 70 °C bleibt. Nach vollständiger Zugabe werden 150 mg (0.48 mmol) 3,6-Bis-(dimethylamino)-anthron in 30 ml trockenem
- 15 Tetrahydrofuran zugegeben, so daß die Temperatur unterhalb von - 60 °C bleibt. Man läßt die Lösung auf Raumtemperatur erwärmen und 18 h bei Raumtemperatur rühren. Man kühlt im Eis-Wasser-Bad ab, löst die Reaktionsmischung in 50 ml Ethanol und säuert mit Trifluoressigsäure an. Diese Lösung wird in einer Mischung aus 50 ml Chloroform und 50 ml Wasser
- 20 suspendiert. Die organische Phase wird abgetrennt, am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt, und säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt. Der Farbstoff wird mit 15 %-igem ethanolischen Chloroform eluiert. Nachdem die Produktphase am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt wurde, wird in Ethanol gelöst und anschließend in 100 ml wässriger 25
- 25 %-ige Natriumperchloratlösung getropft. Nach beendeter Zugabe werden noch 300 ml Wasser zugetropft. Der ausfallende Farbstoff wird filtriert und im Vakuumexsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 50 % (krist. Substanz nach Chromatographie)

Verbindung JF 31

80 mg (0.14 mmol) JF 30 werden in 10 ml einer 1 : 3 Mischung aus 2 M Salzsäure und Aceton 40 min unter Rückfluß erhitzt. Man läßt abkühlen und suspendiert in 50 ml einer 1:1 Mischung aus Chloroform und Wasser. Die Wasserphase wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige mehrmals mit 20 %-igem ethanolischem Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden einrotiert und säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt. Der Farbstoff wird mit 20 %-igem ethanolischen Chloroform eluiert. Nachdem die Produktphase am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt wurde, wird in Ethanol gelöst und anschließend in 100 ml wässriger 25 %-ige Natriumperchloratlösung getropft. Nach beendeter Zugabe werden noch 300 ml Wasser zugetropft. Der ausfallende Farbstoff wird filtriert und im Vakuumexsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 72 % (krist. Substanz nach Chromatographie)

Verbindung JF 32

70 mg (0.12 mmol) JF 31 werden in einer 10 %-iger Natriumhydroxidlösung in 1:1 Ethanol und Wasser 1 h zum Rückfluß erhitzt. Man läßt abkühlen und suspendiert in einer 1:1 Mischung aus Chloroform und Wasser. Man stellt mit Trifluoressigsäure auf pH = 8 und trennt die organische Phase ab. Die wässrige Phase wird mehrmals mit 20 %-igem ethanolischem Chloroform extrahiert. Diese Extraktion wird sooft wiederholt, bis sich kaum noch Farbstoff in der wässrigen Phase befindet (Prüfung durch Ansäuern). Die vereinten organischen Phasen werden mit Trifluoressigsäure auf pH = 2 eingestellt, einrotiert und säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt. Der Farbstoff wird mit 10 %-igem ethanolischen Chloroform eluiert. Nachdem die Produktphase am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt wurde, wird in Ethanol

not gelöst und anschließend in 100 ml wässrige 25 %-ige Natriumperchloratlösung getropft. Nach beendeter Zugabe werden noch 300 ml Wasser zuge-
tropft. Der ausfallende Farbstoff wird filtriert und im Vakuumexsikkator über
Phosphorpentoxid getrocknet.

5

Ausbeute: 57 % (krist. Substanz nach Chromatographie)

Verbindung JF 42

10

70 mg (0.12 mmol) JF 17 werden in 30 ml einer Lösung von 3 g Natriumhydroxid in Ethanol / Wasser (1:1) 1 h zum Rückfluß erhitzt. Man läßt abkühlen und neutralisiert die Lösung mit halbkonzentrierter Salzsäure. Der Farbstoff wird anschließend durch Zutropfen von Wasser ausgefällt. Man filtriert ab
und trocknet das Produkt im Vakuumexsikkator über Phosphorpentoxid.

15

Verbindung JF 36

25.3 g (0.1 mol) 6-(2-Carboxybenzoyl)-N-ethyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin und
20.1 (0.1 mol) N-Ethyl-7-isopropenyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin werden in 500
ml Dichlormethan gelöst und mit 60 g Phosphorpentoxid versetzt. Man erhitzt
2 h unter Rückfluß, läßt abkühlen und destilliert das Lösungsmittel im Vakuum
ab. Der Rückstand wird mit konz. Schwefelsäure versetzt. Diese Lösung
wird 30 min bei Raumtemperatur verrührt. Daraufhin wird die schwefelsaure
Lösung in 1000 ml eisgekühltem Ethanol gegeben und tropfenweise mit 50
ml 60 %-ige Perchlorsäure und 5 l versetzt. Der ausgefallene Farbstoff wird
abfiltriert und im Vakuumexsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

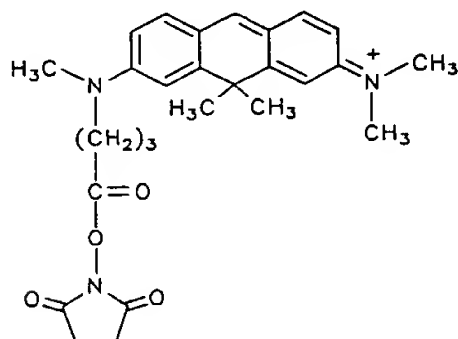
30

Verbindung JF 37

39.1 g (0.1 mol) 6-(2-Carboxy-3,4,5,6-tetrachlorbenzoyl)-N-ethyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin und 20.1 (0.1 mol) N-Ethyl-7-isopropenyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin werden in 500 ml Dichlormethan gelöst und mit 60 g Phosphorpentoxid versetzt. Man erhitzt 2 h unter Rückfluß, läßt abkühlen und destilliert das Lösungsmittel im Vakuum ab. Der Rückstand wird mit konz. Schwefelsäure versetzt. Diese Lösung wird 30 min bei Raumtemperatur verrührt. Daraufhin wird die schwefelsaure Lösung in 1000 ml eisgekühltem Ethanol gegeben und tropfenweise mit 50 ml 60 %ige Perchlorsäure und 5 l versetzt. Der ausgefallene Farbstoff wird abfiltriert und im Vakuumexsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

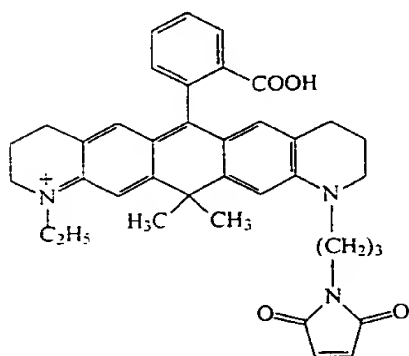
C. Beispiele zur Konjugatbildung**JA 262-Aktivester**

0,1 mmol JA 262 werden mit 0,2 mmol N-Hydroxysuccinimid und 0,2 mmol Dicyclohexylcarbodiimid in 20 ml Acetonitril gelöst. Man läßt 4 h bei Raumtemperatur rühren und rotiert das Produktgemisch ein. Die Reinigung erfolgt chromatographisch (HPLC, RP 18).

**JF 43-Maleinimid**

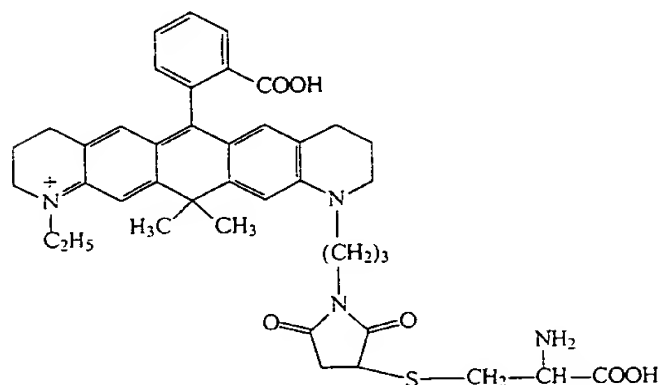
100 mg JF 43 (0.16 mmol) werden in 10 ml getrocknetem DMSO gelöst und mit 100 mg (1 mmol) Maleinsäureanhydrid versetzt. Die Lösung wird bei

Raumtemperatur für 24 h verrührt. Man tropft 50 ml 10 %-ige wässrige Natriumperchloratlösung hinzu und filtriert den ausfallenden Feststoff ab. Der Feststoff wird mit 25 mg Natriumacetat in 5 ml Essigsäureanhydrid suspendiert und für 30 min auf 80 °C erhitzt. Man kühlt ab und tropft 30 ml 10 %-ige wässrige Natriumperchloratlösung hinzu. Der Feststoff wird abfiltriert und getrocknet.



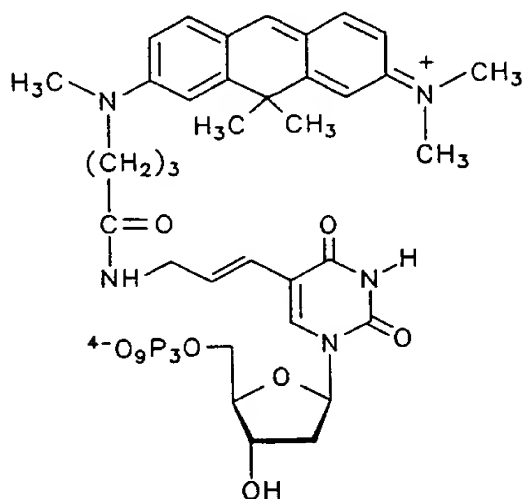
10 JF43-Cystein-Konjugat

70 mg (0.1 mmol) JF 43-Maleinimid wird in 20 ml Ethanol gelöst und portionsweise mit 12 mg (0.1 mmol) Cystein versetzt. Man verrührt die Lösung 30 min bei Raumtemperatur. Daraufhin wird 50 ml 10 %-ige wässrige Natriumperchloratlösung hinzuge tropft und der ausfallende Feststoff abfiltriert und getrocknet.



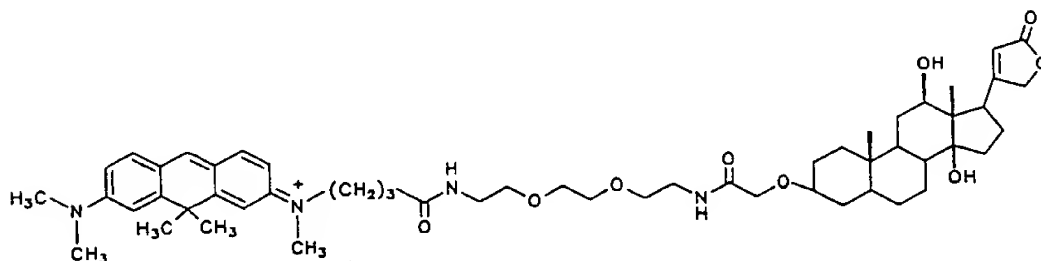
JA 262-dUTP-Konjugat

10 μ mol 5-(3-Aminoallyl)-dUTP werden in 0,5 ml 0,1 M Natriumborat-Puffer (pH 8) gelöst und mit einer Lösung aus 5 μ mol JA 262-Aktivester in 1 ml aminfreiem Dimethylformamid versetzt. Die Lösung wird 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösungsmittel werden im Vakuum abdestilliert und der
 5 Rückstand chromatographisch gereinigt (RP 18).



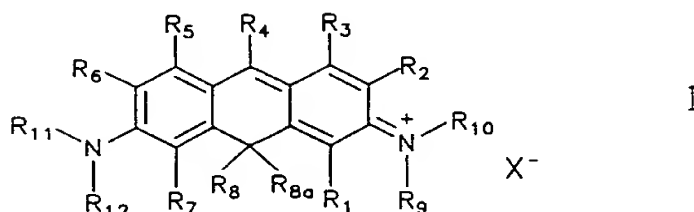
JA 262-Digoxin-3-Carboxymethylether-Diaminodioxaoctan-Konjugat 10 (Dig-CME-DADOO)

0,02 mmol JA 262-Aktivester werden mit 0,02 mmol Dig-CME-DADOO in Acetonitril 18 h bei Raumtemperatur verrührt. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und der Rückstand chromatographisch gereinigt.



Ansprüche

1. Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel I



5 als Markierungsgruppen in einem Verfahren zum Nachweis eines Analyten, wobei

10 R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , und R_7 jeweils unabhängig Wasserstoff, Halogen, eine Hydroxy-, Amino-, Sulfo- oder Carboxy- oder Aldehydgruppe oder eine gesättigte oder ungesättigte, geradkettige, verzweigte oder cyclische Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 20 C-Atomen bedeuten, wobei die Kohlenwasserstoffgruppen Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Cycloalkyl-, Aryl-, insbesondere Phenyl-, oder/und Heteroarylreste umfassen und gegebenenfalls Heteroatome wie Sauerstoff-, Schwefel- oder Stickstoffatome oder/und mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Phospho-, Carboxy-, Aldehyd-, C_1 - C_4 -Alkoxy- oder/und C_1 - C_4 -Alkoxycarbonylgruppen enthalten,

15 oder einer oder mehrere der Reste R_1 - R_7 jeweils mit benachbarten Substituenten ein Ringsystem bilden, das eine oder mehrere Mehrfachbindungen enthalten kann,

20 R_8 und R_{8a} jeweils unabhängig eine gesättigte oder ungesättigte, geradkettige, verzweigte oder cyclische Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 20 Kohlenstoffatomen, z.B. eine C_1 - C_6 -Alkylgruppe, insbesondere Methyl, Ethyl, Propyl oder/und Butyl, oder eine Aryl- oder Heteroarylgruppe, insbesondere Phenyl, bedeuten, die gegebenenfalls Heteroatome wie Sauerstoff-, Schwefel- oder Stickstoffatome oder/und einen oder mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Hy-

25

droxy-, Amino-, Sulfo-, Phospho-, Carboxy-, Aldehyd-, C₁-C₄-Alkoxy-
oder/und C₁-C₄-Alkoxy-carbonylgruppen, enthalten,

oder auch R₈ und R_{8a} ein Ringsystem bilden können,

R₉, R₁₀, R₁₁ und R₁₂ jeweils unabhängig Wasserstoff oder eine gesät-

tigte oder ungesättigte, geradkettige, verzweigte oder cyclische Koh-

lenwasserstoffgruppe mit bis zu 20 C-Atomen, z.B. Polyether, Phenyl,

Phenylalkyl mit 1-3 C-Atomen in der Kette bedeuten, wobei die Koh-

lenwasserstoffgruppen gegebenenfalls Heteroatome wie Sauerstoff-,

Schwefel- oder Stickstoffatome oder/und einen oder mehrere Substitu-

enten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Hydroxy-, Amino-,

Sulfo-, Phospho-, Carboxy-, Carbonyl-, Alkoxy- oder/und Alkoxy-car-

bonylgruppen enthalten können,

oder einer oder mehrere der Reste R₉-R₁₂ jeweils mit benachbarten

Substituenten ein Ringsystem bilden, das eine oder mehrere Mehrfach-

bindungen enthalten kann,

wobei -N(R₉)(R₁₀) oder/und =N(R₁₁)(R₁₂) durch -OR⁹ oder/und =O
ersetzt sein können,

und X gegebenenfalls zum Ladungsausgleich vorhandene Anionen be-
deutet.

2. Verwendung nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet,

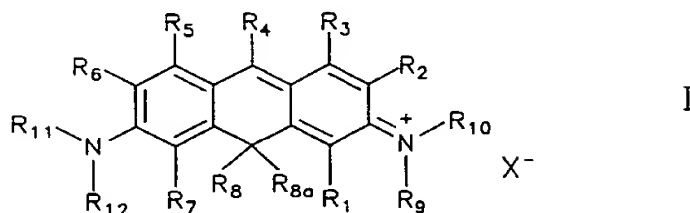
daß die Verbindung I kovalent an einen für den nachzuweisenden Ana-
lyten spezifischen Rezeptor gekoppelt wird.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2,

dadurch gekennzeichnet,

daß das Nachweisverfahren aus Nukleinsäure-
Hybridisierungsverfahren und immunchemischen Verfahren ausgewählt
wird.

4. Verbindungen der allgemeinen Formel I



wobei R_1 - R_{12} und X die in Anspruch 1 angegebenen Bedeutungen besitzen, mit der Maßgabe, daß, wenn R_1 - R_3 und R_5 - R_7 Wasserstoff sind und R_8 , R_{8a} und R_9 - R_{12} Methyl sind,
 R_4 nicht Wasserstoff, Methyl, Isopropyl, Phenyl, 2,6-Dimethylphenyl- oder 2-Isopropenylphenyl ist.

5. Verbindungen nach Anspruch 4,

dadurch gekennzeichnet,

daß R_6 mit R_{11} oder/und R_7 mit R_{12} , R_1 mit R_{10} oder/und R_2 mit R_9 verbrückt sind und ein Ringsystem, das vorzugsweise 5- oder 6-gliedrige Ringe enthält, bilden, welche eine oder mehrere Mehrfachbindungen enthalten können.

6. Verbindungen nach Anspruch 4 oder 5,

dadurch gekennzeichnet,

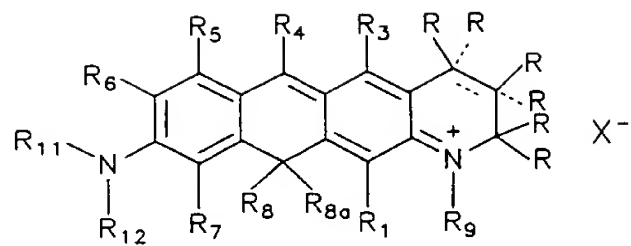
daß R_4 Wasserstoff, C_1 - C_6 -Alkyl oder einen ein aromatisches Ringsystem enthaltenden Rest bedeuten.

7. Verbindungen nach einem der Ansprüche 4 bis 6,

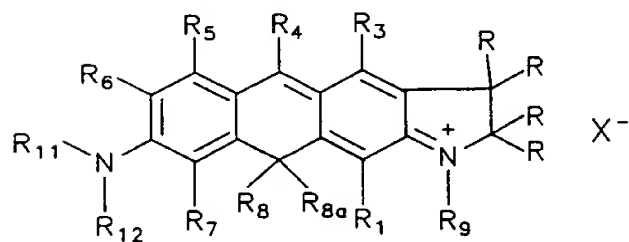
dadurch gekennzeichnet,

daß R_8 und R_{8a} jeweils unabhängig Methyl, Ethyl oder/und Phenyl sind.

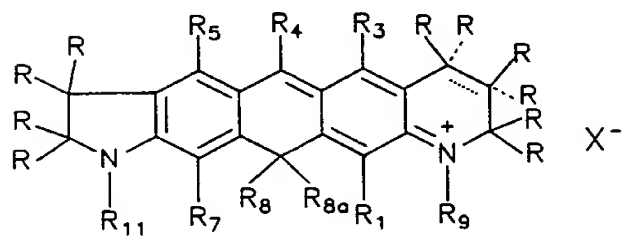
8. Verbindungen nach einem der Ansprüche 4 bis 6, die einer der allgemeinen Formeln IVa bis IVe entsprechen.



IVa

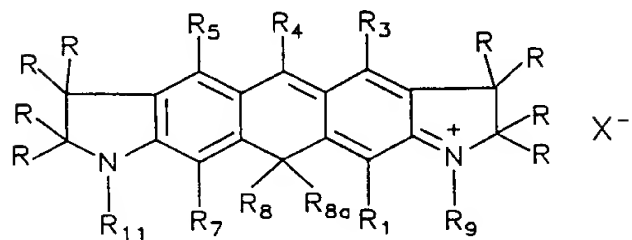


IVb

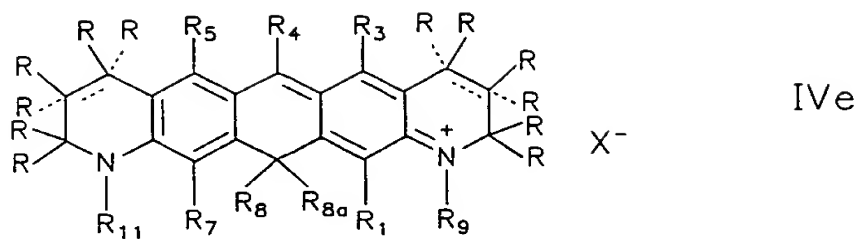


IVc

5



IVd



worin

die gestrichelten Linien gegebenenfalls Doppelbindungen bedeuten und bei Vorhandensein der Doppelbindungen die über eine gestrichelte Linie gebundenen Reste R fehlen,

R_1 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_{8a} , R_9 , R_{11} , R_{12} und X wie in Anspruch 1 definiert sind,

und R bei jedem Auftreten gleich oder verschieden sein kann und wie R_1 - R_7 in Anspruch 1 definiert ist.

10

9. Verbindungen nach einem der Ansprüche 4 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
 daß sie eine zur kovalenten Kopplung fähige Gruppe aufweisen.

15

10. Verbindungen nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
 daß die Kopplungsgruppe -COOH, -NH₂, -OH oder/und -SH ist.

20

11. Verbindungen nach Anspruch 9 oder 10,
dadurch gekennzeichnet,
 daß sie über Kopplungsgruppen an einen Träger oder/und an ein Biomolekül gekoppelt sind.

25

12. Verbindungen nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
 daß der Träger ausgewählt ist aus porösem Glas, Ionenaustauschhar-

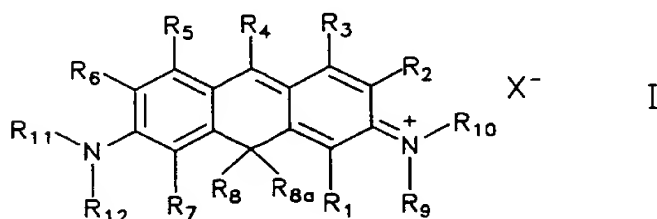
zen, Dextranen, Cellulose, Cellulosederivaten oder/und hydrophilen Polymeren.

13. Verbindungen nach Anspruch 10,

dadurch gekennzeichnet,

daß das Biomolekül ausgewählt ist aus Peptiden, Polypeptiden, Nukleotiden, Nukleosiden, Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloge oder/und Haptenen.

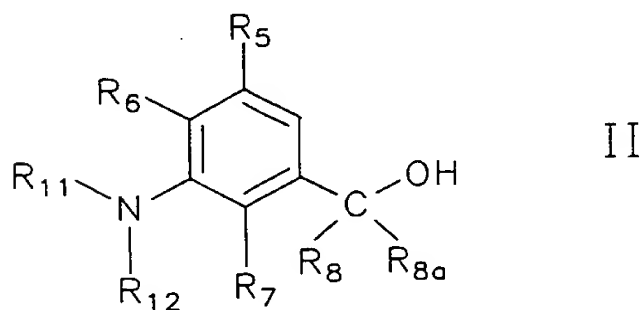
14. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I



wobei R₁-R₁₂ und X die in Anspruch 1 angegebenen Bedeutungen besitzen,

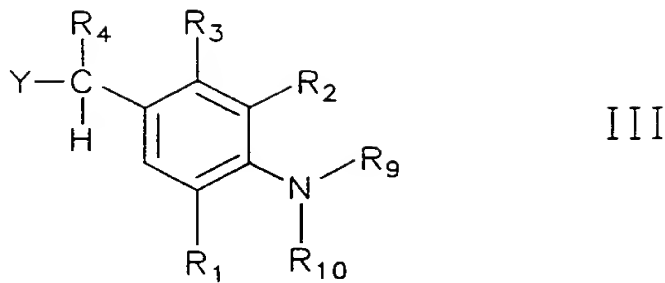
dadurch gekennzeichnet,

daß man eine Verbindung der allgemeinen Formel II



worin R₅, R₆, R₇, R₈, R_{8a}, R₁₁, R₁₂ wie in Anspruch 1 definiert sind, oder das Dehydratationsprodukt von II

mit einer Verbindung der allgemeinen Formel III oder deren Dehydratationsprodukt



worin R_1 - R_4 , R_9 und R_{10} wie in Anspruch 1 definiert sind und Y ein Halogen, insbesondere Brom, eine Hydroxy- oder Thiogruppe bedeutet, in einem geeigneten Lösungsmittel, unter sauren Bedingungen und in Gegenwart eines Katalysators umgesetzt und die durch Ringschluß zwischen der Verbindung II oder deren Dehydratationsprodukt und der Verbindung III oder deren Dehydratationsprodukt gebildete Verbindung gegebenenfalls durch Oxidation zum Farbstoff I umgesetzt.

- 10 15. Verfahren nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Lösungsmittel ein unpolares Lösungsmittel, insbesondere Methylenchlorid, 1,2-Dichlorethan oder Chloroform ist.
- 15 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Katalysator Bortrichlorid ist.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16,
20 **dadurch gekennzeichnet,**
daß die Säure Schwefelsäure, Phosphorsäure oder Polyphosphorsäure ist.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17,
25 **dadurch gekennzeichnet,**
daß das Oxidationsmittel Tetrabutylammonium(meta)periodat ist.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Verbindung (I) ohne Isolierung von Zwischenprodukten
gewinnt.

5

10

15

20

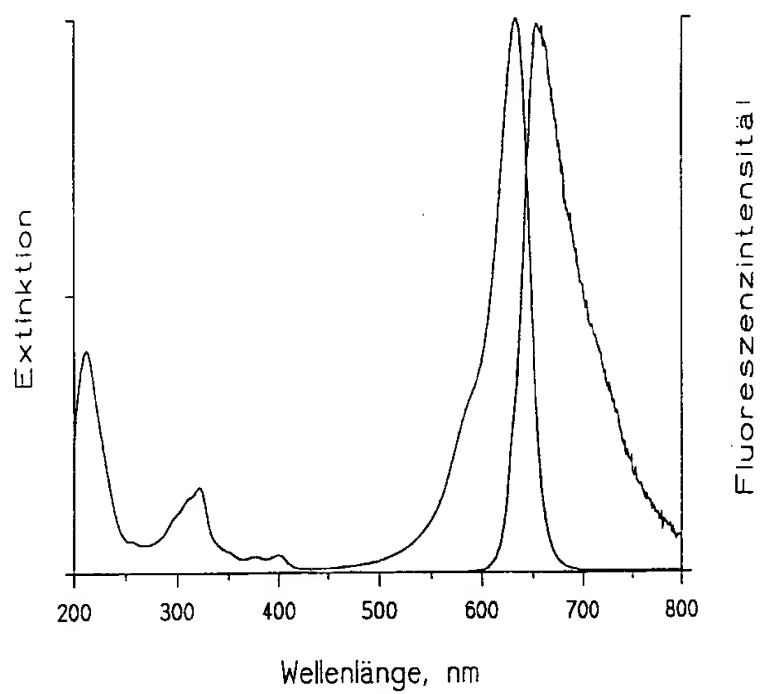
25

30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Absorptions- und Fluoreszenzspektren in Ethanol

Fig. 1: AZ 2



5

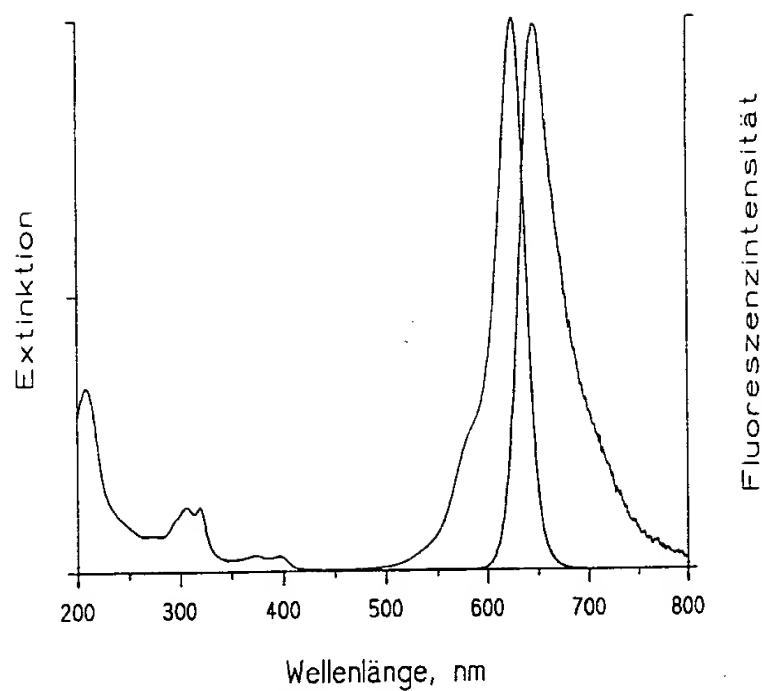
10

15

THIS PAGE BLANK (USPTO)

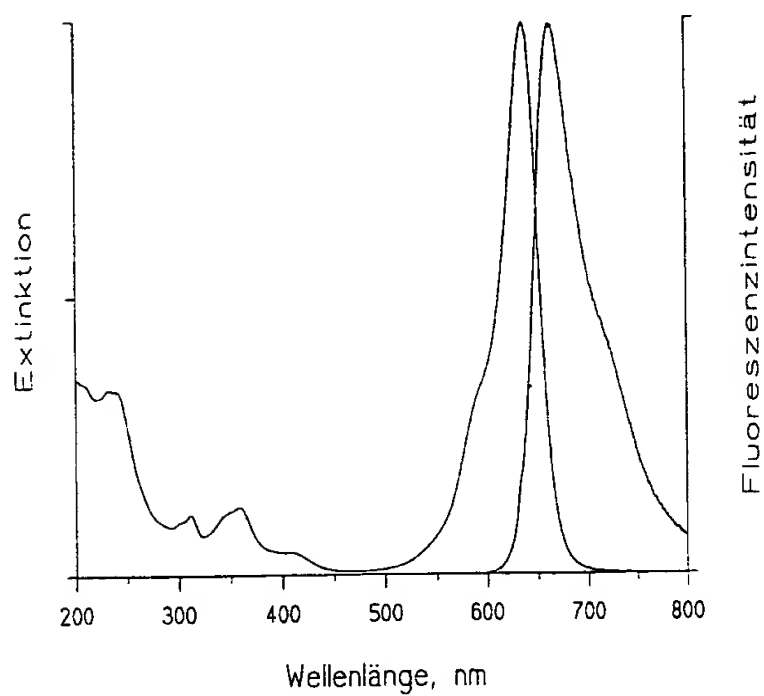
2 / 3

Fig. 2: AZ 13



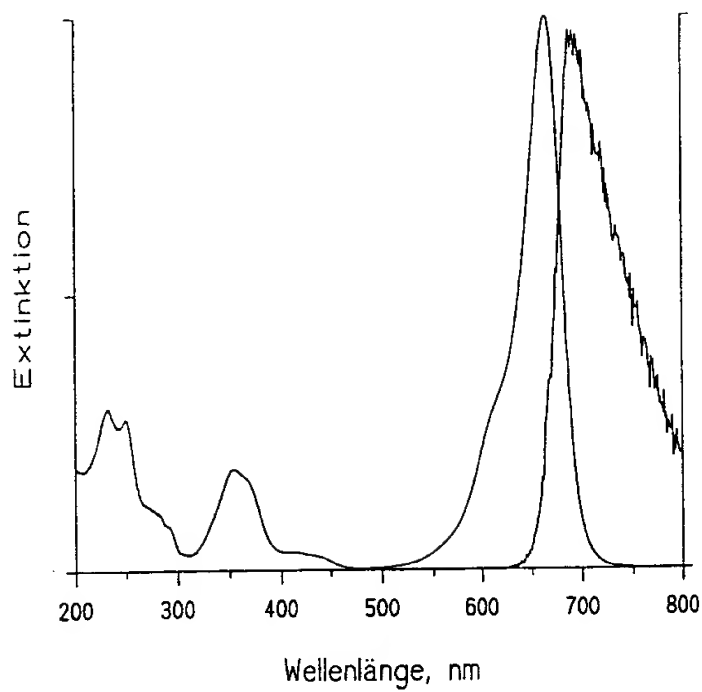
5

Fig. 3: JA 268



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 4: AZ 11



5

10

15

THIS PAGE BLANK (USPTO)